

cont H 6  
09 914 823



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>A61K 35/80, A23L 1/337, A01K 61/00</b>		<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 97/25998</b> (43) Date de publication internationale: 24 juillet 1997 (24.07.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00106 (22) Date de dépôt international: 20 janvier 1997 (20.01.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/00522 18 janvier 1996 (18.01.96) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): TEXINFINE S.A. [FR/FR]; 60, rue Duguesclin, Boîte postale 6114, F-69466 Lyon Cédex 06 (FR). LABORATOIRE LAPHAL [FR/FR]; Avenue de Provence, Boîte postale 09, F-13190 Allauch Cédex (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): GUTIERREZ, Gilles [FR/FR]; 39, rue Lieutenant-Colonel-Prévost, F-69006 Lyon (FR). (74) Mandataire: BURTIN, Jean-François; Cabinet GEFIB, 85, rue Anatole-France, F-92300 Levallois Perret (FR).		(81) Etats désignés: AU, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, HU, IL, JP, KR, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RU, SG, SK, TR, US, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: SUBSTANCES EXTRACTED FROM DICTYOTALES, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND COMPOSITIONS CONTAINING SAME (54) Titre: SUBSTANCES EXTRAITES DE DICTYOTALES, LEUR PROCEDE D'OBTENTION ET LES COMPOSITIONS EN RENFERMANT (57) Abstract <p>Biological substances and particularly biologically active substances of marine origin are disclosed. The novel biologically active substances are extracts of plants of the dictyotales family and have characteristic analytical properties. A method for preparing said novel substances and pharmaceutical, cosmetic and/or food compositions containing such substances are also disclosed. Said biologically active substances are useful for preparing pharmaceutical, cosmetic and/or food compositions for altering the synthesis of glycosylated elements in the extracellular matrix of human and animal tissues.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention se rapporte au domaine de la biologie, et plus précisément à des substances biologiquement actives d'origine marine. La présente invention concerne de nouvelles substances biologiquement actives extraites de plantes de la famille des Dictyotales et caractérisées par leurs caractéristiques analytiques. L'invention concerne encore un procédé d'obtention de ces nouvelles substances, ainsi que les compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires en renfermant. Les substances biologiquement actives de l'invention sont utilisées en vue de la réalisation de compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires destinées à remanier la synthèse des éléments glycosylés de la matrice extracellulaire des tissus animaux et humains.</p>			

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

SUBSTANCES EXTRAITES DE DICTYOTALES, LEUR PROCEDE D'OBTENTION ET LES COMPOSITIONS EN RENFERMANT.

- 5 La présente invention se rapporte au domaine de la biologie, et plus précisément à des substances biologiquement actives d'origine marine.

La présente invention concerne de nouvelles substances biologiquement actives extraites de plantes de la famille des Dictyotales, leur procédé d'obtention et les  
10 compositions en renfermant.

Les compositions de la présente invention sont destinées à remanier la synthèse des éléments glycosylés de la Matrice Extra Cellulaire (MEC) des tissus animaux et humains.

15

Par le terme plantes de la famille des Dictyotales, il faut comprendre plus particulièrement celles susceptibles de fixer, condenser, précipiter ou d'effectuer sur leur thalle la synthèse du carbonate de calcium sous la forme cristalline dite aragonite.

- 20 Le terme de plantes peut concerner la plante sèche ou fraîche, broyée ou brute.

Les plantes desquelles sont extraites les substances biologiquement actives de l'invention, sont des Phéophycées, classe des Fucophyceae, ordre des Dictyotales, famille des Dictyotaceae. Seuls quelques genres appartiennent à la  
25 famille des Dictyotales, il s'agit de Padina, Zonaria ou Dictyota. Le genre Padina regroupe les espèces les plus fréquentes. A titre d'exemple, il est possible de trouver sur le rivage de la Méditerranée les espèces pavonica, boyana (P. tenuis), boergesenii, sur les rives du Pacifique (non repris les espèces déjà citées) : arborescens, australis, boryana, caulens, commersonii, conrescens, crasse,  
30 durvillei, elegans, fernandeziana, fraseri, gymnospora, de même sur les rives de l'Océan Atlantique : glabra, haitensis, distromatica, dubia. Il existe aussi des espèces typiques de l'océan Indien. L'une des caractéristiques de ces plantes est de fixer sur leur thalle une couche de carbonate de calcium de type aragonite ou

orthorhombique à la surface des frondes. Cette caractéristique est obtenue par l'examen en diffraction X de la poudre obtenue avec ces plantes. La diffraction des rayons X montre que la poudre de ces plantes présente des pics d'intensité notable aux angles  $2\theta$  :  $-3,393^\circ$ ,  $-3,268^\circ$ ,  $-2,699^\circ$ ,  $-2,682^\circ$ ,  $-2,371^\circ$ ,  $-2,336^\circ$  (doublet),  $-1,976^\circ$ ,  $-1,877^\circ$  (doublet). Ces angles de diffraction sont caractéristiques de l'aragonite.

La présente invention a pour objet de nouvelles substances biologiquement actives, remaniant la synthèse des éléments glycosylés de la matrice extracellulaire des tissus animaux et humains, extraites de plantes de la famille des Dictyotales.

Ces nouvelles substances biologiquement actives, sont notamment caractérisées par une structure polycyclique portant une chaîne latérale ayant de 4 à 10 atomes de carbone en ligne droite ou ramifiée et comportant une ou deux doubles liaisons.

Les nouvelles substances sont encore caractérisées par des données analytiques plus précises.

La présente invention concerne encore un procédé d'obtention des substances biologiquement actives extraites de plantes de la famille des Dictyotales.

Dans un premier temps, la plante de la famille des Dictyotales est soumise, après récolte, à un séchage, si possible à l'abri de la lumière, pour garder intactes ses propriétés pharmacologiques.

Un séchage lent avec une insolation importante conduit à l'obtention de substances peu actives et instables. De ce fait, on utilise de préférence un séchage selon des méthodes plus appropriées, avec pour principale condition que l'on obtienne des substances actives.

Pour cette raison, on procède au séchage des plantes broyées ou brutes, par ventilation sans chauffage et on obtient ainsi un matériel végétal de couleur marron foncé sur lequel contrastent vivement les stries blanches de carbonate de calcium.

Une autre méthode, bien que moins économique, donne également satisfaction : elle consiste à égoutter fortement les plantes, puis à les sécher sous vide d'air. La

lyophilisation de la plante, broyée ou non, permet d'une manière avantageuse d'obtenir un produit anhydre.

Ces deux dernières techniques donnent un matériel de couleur vert brun foncé, très fragile et facilement réduit en poudre, ce qui facilite l'extraction par un solvant pour obtenir les substances biologiquement actives.

L'intérêt d'une plante fortement séchée est d'obtenir une matière végétale qui se conserve bien (à l'abri de l'humidité) et à partir de laquelle il sera possible d'extraire la ou les substances actives, stabilisée(s) ou non, sans être gêné par la présence d'un solvant polaire. De plus, les plantes complètement séchées sont plus faciles à réduire en poudre.

Le procédé d'obtention des substances biologiquement actives est caractérisé en ce que l'on soumet la plante de la famille des Dictyotales à un séchage, et/ou à une lyophilisation, à un broyage, suivi d'un ou plusieurs épuisement de la matière végétale par un solvant organique choisi dans le groupe formé des alcanols inférieurs (éthanol...), des cétones aliphatiques (acétone...), des alcanes (pentane, hexane, heptane...), des cycloalcanes (cyclohexane...), des solvants halogénés (chloroforme, dichlorométhane...), des solvants aromatiques, des esters (acétate d'éthyle...), des éthers et similaires, pour obtenir un extrait organique de la plante, on sèche l'extrait organique par évaporation du solvant, on purifie l'extrait organique sec par une ou plusieurs étapes de purification réalisées successivement par affrontement liquide/liquide, par chromatographie sur colonne basse pression ou haute pression, par chromatographie liquide haute performance, pour obtenir les substances actives des plantes de la famille des Dictyotales.

Les solvants organiques peuvent être utilisés seul ou en association. De manière générale, on peut utiliser des solvants organiques miscibles à l'eau, ainsi que tous les solvants susceptibles d'extraire les substances actives des frondes de la plante.

Les solvants seront de préférence encore choisis parmi les solvants volatils dès lors que l'on désire obtenir des substances biologiquement actives débarrassées

de solvant. En effet, les solvants volatils dissolvant les substances biologiquement actives pourront être évaporés à partir d'un support comme de la cellulose ou ses dérivés, de la silice colloïdale, des alcanes de haut poids moléculaire tels des paraffines, des solvants amphiphiles comme le polyéthylène glycol (PEG), le propylène glycol, ou encore de produits inertes comme le glycérol etc.

Le solvant organique sera de préférence, l'acétone ou l'éthanol.

Le rapport utilisé est de préférence de 1 gramme de matière végétale sèche pour 5 ml de solvant et, les temps de contact entre la matière végétale et le solvant organique sont de préférence de 4 à 5 jours.

Néanmoins, lors de la macération, on a utilisé, avec de bons résultats, des rapports très variables de matière sèche par rapport au solvant. Les volumes mis en oeuvre pour une même quantité de matière sèche varient de 1 à 50. De même, les temps de contact entre le solvant organique et la matière végétale varient de 12 heures à 5 jours.

De plus, bien que plus délicate à mettre en oeuvre, l'extraction aqueuse en milieu ammoniacal donne des résultats satisfaisants.

Pour réaliser l'extraction des substances biologiquement actives, il n'est pas nécessaire de faire macérer les matières végétales dans le solvant choisi, il est possible de faire passer en continu le solvant sur la poudre (percolation). Il suffit de régler le débit et de concentrer l'extrait pour obtenir une solution d'activité choisie.

Dans le cas présent, la plante de la famille des Dictyotales une fois séchée, et/ou lyophilisée et broyée, est soumise à un ou plusieurs épuisements par la mise en contact de la plante avec de l'acétone, pendant 4 à 5 jours et dans les proportions de 1 gramme de matière pour 5 ml d'acétone.

L' extrait acétonique obtenu est séché par évaporation du solvant, puis purifié par les étapes de purification définies ci-après.

La première étape de purification est réalisée par affrontement liquide/liquide. Le résidu ou extrait acétonique sec est repris par un mélange méthanol/eau qui est affronté à de l'hexane. Dans un deuxième temps, la phase hydrométhanolique est affrontée, après concentration et dilution dans l'eau, à l'éther.

5 De cette manière, la phase étherée finale est biologiquement active.

La deuxième étape de purification est réalisée par chromatographie sur colonne basse pression. Le support utilisé est un gel de type Sephadex LH 20 ®.

10 L'élution s'effectue par un gradient chloroforme/méthanol. La fraction biologiquement active est éluée en chloroforme/méthanol dans les proportions 97/3 volume à volume. Lors du rinçage de la colonne par un mélange chloroforme/méthanol 70/30, on élue une deuxième fraction active résiduelle.

15 Les étapes suivantes de purification ont lieu par chromatographie liquide haute performance (HPLC) semi préparative. Les dimensions de la colonne sont de 250 mm (pour la longueur) et de 10 mm (pour le diamètre). Les supports utilisés sont : une silice greffée C<sub>18</sub> et une silice greffée diol. Le débit est de 8 ml/min.

Sur le support silice greffée diol, avec un éluant hexane/isopropanol 92/8, les fractions actives sont éluées entre 20 et 25 min et 35 et 40 min.

20 Sur le support silice greffée C<sub>18</sub>, avec un éluant acétonitrile/eau 85/15, la fraction active est éluée entre 15 et 17 min, et avec un éluant acétonitrile/eau/acide acétique 85/15/0,05, les fractions actives sont éluées entre 17 et 20 min et 30 et 40 min.

25 A l'issue de ces étapes de purification, on obtient une substance biologiquement active de couleur jaune-verte.

On procède à différentes méthodes analytiques (spectres UV, IR, RMN, chromatographie sur couche mince...) de caractérisation de la ou des substances biologiquement actives, extraites de plantes de la famille des Dictyotales.

30

Le spectre UV de la fraction active finale, réalisé dans le méthanol est caractérisé par plusieurs bandes d'absorption situées à 202 nm avec un épaulement à 228 nm, entre 260 et 270 nm, entre 400 et 460 nm, et, à 630 nm.

A l'issue de ces étapes de purification, on réalise encore une chromatographie sur couche mince (CCM) avec révélation chimique (les révélateurs utilisés sont l'anisaldéhyde sulfurique, la vanilline sulfurique, le phosphomolybdate, l'acide sulfurique éthanolique). Après révélation, on note la présence de plusieurs tâches.

5 Les temps de rétention frontale sont :  $R_f = 0,15$  et  $0,90$ ,  $0,95$ , et correspondent à des zones biologiquement actives issues d'une CCM préparative réalisée dans les mêmes conditions, à savoir, plaque de CCM avec silice greffée diol, élution par hexane/isopropanol 85/15.

10 Les spectres de masse, les spectres IR et les spectres RMN du proton ou du carbone 13, ont également permis de compléter les informations quant à la structure des nouvelles substances biologiquement actives extraites de plantes de la famille des Dictyotales selon l'invention.

L'analyse du spectre RMN du carbone 13 démontre notamment la présence de la  
15 chaîne latérale ayant de 4 à 10 atomes de carbone, en ligne droite ou ramifiée et comportant une à deux doubles liaisons, portée par la structure polycyclique.

Les substances biologiquement actives extraites de plantes de la famille des Dictyotales, ont également pu être obtenues par macération ou lixiviation de 1g de  
20 matière végétale sèche dans 5 ml d'éthanol pur pendant 12 heures.

L'éthanol est un solvant bien accepté par les cellules et il est entièrement miscible aux solutions nutritives aqueuses dans lesquelles baignent les cellules.

Les étapes suivantes de purification ont ensuite été réalisées.

On réalise une chromatographie haute pression sur une colonne de silice normale.

25 On injecte 20  $\mu$ l de la fraction biologiquement active dans un chromatographe haute pression puis élue la fraction avec un mélange heptane/éther (90/10) sous un débit de 2 ml/min. Toute l'activité des substances extraites des plantes de la famille des Dictyotales se retrouve dans la fraction éluee entre 6,9 min et 8,5 min.

Il est possible de procéder de la même façon par chromatographie liquide haute  
30 performance (HPLC). La colonne d'HPLC est garnie avec une silice greffée en  $C_{18}$ , l'éluant est un mélange méthanol/eau 80/20, et le débit est de 4 ml/min. Toute l'activité des substances extraites est alors concentrée dans la fraction éluee après un temps de rétention compris entre 16 et 18 min.



Le chromatogramme réalisé avec un détecteur à diffusion de lumière montre, à ce temps de rétention, une certaine quantité de substance qui constitue la fraction active de la plante à condition de travailler sous une pression réduite, de telle manière que l'évaporation de la phase mobile ne se fasse pas avec entraînement de la fraction active.

Ainsi, les nouvelles substances biologiquement actives extraites de plantes de la famille des Dictyotales sont donc caractérisées lors des étapes de purification, et lorsque les épuisements ont été effectués à l'acétone, par les données analytiques suivantes :

- des temps de rétention, en chromatographie liquide haute performance semi-préparative sur le support silice greffé diol et avec un éluant hexane/isopropanol 92/8, compris entre 20 et 25 min et 35 et 40 min.

- un temps de rétention, en chromatographie liquide haute performance semi-préparative sur le support silice greffée C<sub>18</sub> et avec un éluant acétonitrile/eau 85/15, compris entre 15 et 17 min.

- des temps de rétention, en chromatographie liquide haute performance semi-préparative sur le support silice greffée C<sub>18</sub> et avec un éluant acétonitrile/eau/acide acétique 85/15/0,05, compris entre 17 et 20 min et 30 et 40 min.

Lors des étapes de purification et lorsque les épuisements ont été effectués à l'éthanol, les données analytiques sont :

- un temps de rétention, en chromatographie haute pression sur colonne de silice normale et avec un éluant heptane/éther (90/10), compris entre 6,9 min et 8,5 min.

- un temps de rétention, en chromatographie liquide haute performance garnie d'une colonne de silice greffée C<sub>18</sub> et avec un éluant méthanol/eau 80/20, compris entre 16 et 18 min.

Les substances biologiquement actives sont encore caractérisées à l'issue des étapes de purification, et lorsque les épuisements ont été effectués à l'acétone, par les données analytiques suivantes :

-un spectre UV dans le méthanol, présentant plusieurs bandes d'absorption situées à 202 nm avec un épaulement à 228 nm, entre 260 et 270 nm, entre 400 et 460 nm, et, à 630 nm.

5 - une chromatographie sur couche mince (CCM) présentant, après révélation chimique (anisaldéhyde sulfurique, vanilline sulfurique, phosphomolybdate, acide sulfurique éthanolique), des temps de rétention frontale de 0,15, 0,90 et 0,95.

10 Les substances extraites avec les solvants organiques sont souvent délicates à manipuler (évaporation, hydratation, risque de déflagration ...), il est donc souhaitable de les fixer sur un ou des supports solides tel qu'un polymère organique absorbant comme par exemple la cellulose, des minéraux ou des compositions minérales absorbantes ou des adsorbants (Silice colloïdale ...), des produits plus inertes comme les paraffines, les polyéthylènes glycols (PEG) , les propylène glycols, la polyvinylpyrrolidone etc...Tous les supports inertes peu  
15 oxygénés, peuvent convenir.

20 Les caractéristiques des substances fixées peuvent être très variables selon les conditions d'extraction des substances des plantes de la famille des Dictyotales, la matière de fixation, les conditions de stabilisation et la matière sur laquelle est fixé le solvant d'extraction. La consistance est donc variable et la couleur peut varier du vert franc au marron.

La présente invention concerne encore les substances biologiquement actives adsorbées sur un matériau inerte minéral ou organique puis dessolvatées.

25 Les substances biologiquement actives selon l'invention, extraites de plantes de la famille des Dictyotales manifestent des propriétés pharmacologiques très intéressantes, et trouvent de ce fait un emploi en thérapeutique, en cosmétique, en alimentation, en diététique humaine et vétérinaire, en implantologie et en chirurgie osseuse ou articulaire.

30 Ces substances sont destinées à être utilisées sous forme de compositions ou d'implants pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires.

Les substances biologiquement actives, extraites de plantes de la famille des Dictyotales, sont destinées à remanier la synthèse des éléments glycosylés de la matrice extracellulaire (MEC) des tissus animaux et humains. Ces substances stimulent la synthèse des glycosaminoglycanes (GAG) tels l'acide hyaluronique, la chondroïtine, les acides chondroïtines sulfuriques, l'acide dermatane sulfurique, l'acide héparane sulfurique, l'héparine, l'acide kératane sulfurique, la synthèse des protéoglycanes tels l'aggrécane, la décorine, le biglycane, le versicane, la fibromoduline, le fibroglycane, le syndécane, le bétaglycane, le glypican.

10 Les substances biologiquement actives selon l'invention sont donc utilisées en vue de la réalisation de compositions destinées à remanier la synthèse des éléments glycosylés de la matrice extracellulaire (MEC) des tissus animaux et humains, et notamment à stimuler la synthèse des glycosaminoglycanes (GAG) et des protéoglycanes de la matrice extracellulaire (MEC) des tissus animaux et humains.

15 Les substances de la présente invention sont notamment utilisées en vue de la réalisation de compositions cosmétiques ou dermatologiques destinées à améliorer les synthèses glycosylées des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes dans la peau.

20 Les substances de la présente invention stimulent les synthèses protéiques et les synthèses glycosidiques des cellules du tissu connectif ou du mésenchyme.

Les substances sont utilisées en vue de la réalisation de compositions topiques destinées à remodeler indirectement l'activité des cellules connectives ou mésenchymateuses par action directe sur les cellules épithéliales.

25 Les substances extraites de plantes de la famille des Dictyotales stimulent les synthèses golgiennes et membranaires des glycosaminoglycanes de la MEC et les synthèses golgiennes des protéoglycanes de la MEC.

Ainsi, ces substances accroissent par exemple la synthèse des collagènes, de l'acide chondroïtine sulfurique, de l'acide dermatane sulfurique, de l'acide hyaluronique...

Ces substances sont utilisées en vue de la réalisations de compositions destinées à stimuler les synthèses golgiennes et membranaires des glycosaminoglycanes de la MEC et les synthèses golgiennes des protéoglycanes de la MEC.

Les substances de la présente invention sont actives sur les cellules de la peau  
5 (fibroblastes, kératinocytes), sur les cellules de l'os (ostéoblastes, chondrocytes),  
et sur les cellules du tissu articulaire non osseux (synoviocytes).

Chez l'homme, l'ingestion des substances biologiquement actives extraites des plantes de la famille des Dictyotales, tout comme la plante à l'état sec elle même, provoque une augmentation de la synthèse des éléments glycosylés de la MEC  
10 des tissus mésenchymateux et plus particulièrement de la peau (derme et épiderme), de l'os (cartilage, os spongieux, os trabéculaire, cartilage de conjugaison...).

Ainsi, les substances extraites de plantes de la famille des Dictyotales sont notamment utilisées en vue de la réalisation de compositions pharmaceutiques  
15 destinées à prévenir et/ou à traiter les lésions tissulaires de la peau, de l'os et du cartilage.

D'une manière générale, ces substances sont utilisées en vue de la réalisation de compositions destinées à prévenir et/ou à traiter les affections impliquant des éléments glycosylés de la matrice extracellulaire des tissus animaux et humains.

20

La demanderesse a démontré dans ses travaux que cette activité diffère de celle induite par la plupart des substances activatrices telles que l'estradiol et la vitamine D<sub>3</sub> (1-25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), la vitamine C, etc... La ou les substances actives contenues dans les plantes expriment leur activité même en présence d'agents  
25 délétères comme les interleukines (par exemple IL-1), ces substances biologiquement actives ont donc une activité réparatrice.

Ces substances biologiquement actives ont également une activité indirecte sur les cellules, en agissant par l'intermédiaire de messagers tels qu'une cytokine, un facteur de croissance ou une hormone, sécrétés par la première population  
30 cellulaire atteinte par les substances actives extraites des plantes, et destinés aux cellules cibles.

L'activité des substances extraites des plantes de la famille des Dictyotales se retrouve exprimée sur des cellules provenant d'espèces animales appartenant à

des embranchements aussi divers que les annélidés, les ascidies, les arthropodes, les mollusques, les bivalves (conchifères), les échinodermes, les oiseaux et les mammifères.

5 Les substances biologiquement actives extraites de plantes de la famille des Dictyotales sont encore utilisées en vue de la réalisation de compositions alimentaires destinées à améliorer l'élevage des arthropodes, des conchifères, ainsi que la qualité des coquilles des oeufs.

10 Les substances extraites de plantes de la famille des Dictyotales présentent également un grand intérêt en chirurgie osseuse. En effet, ces substances préservent le phénotype des ostéoblastes humains lors des greffes et peuvent être insérées avec un biomatériau implanté au voisinage d'une articulation pour régénérer l'os et les surfaces articulaires.

15 Les substances sont donc également utilisées en vue de la réalisation de compositions destinées à prévenir et/ou à traiter les affections articulaires.

20 Les substances de la présente invention sont également utilisées en vue de la réalisation de compositions à usage local destinées à prévenir et/ou à traiter les affections loco-régionales impliquant des éléments glycosylés de la matrice extracellulaire.

25 Les substances biologiquement actives sont encore utilisées en vue de la réalisation de compositions destinées à prévenir et/ou à traiter les affections liées à une dégénérescence de la matrice extracellulaire, ainsi qu'à régénérer le tissu cartilagineux, ou à compléter les aliments.

30 La présente invention concerne encore les compositions pharmaceutiques, cosmétiques, et/ou alimentaires remaniant la synthèse des éléments glycosylés de la matrice extracellulaire des tissus animaux et humains, caractérisées en ce qu'elles renferment à titre de principe actif une ou plusieurs substances biologiquement actives extraites des plantes de la famille des Dictyotales, en association ou en mélange avec un excipient ou un véhicule inerte, non toxique,

approprié à l'usage envisagé, et éventuellement un ou plusieurs principes actifs à action complémentaire.

5 Les compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires selon l'invention sont destinées à l'administration par voie digestive, parentérale, percutanée, topique ou rectale. Les compositions sont donc présentées sous forme de comprimés nus ou enrobés, de dragées, de capsules, de gélules, de pilules, de tablettes, de cachets, de sirops, de poudres à ingérer ou à usage externe, de compositions adjuvantes pour la cicatrisation postopératoire, pour les brûlures, les  
10 traumatismes ; de suppositoires ; de solutés ou de suspensions injectables conditionnés en ampoules ; de crèmes, de gels ou de pommades ; de solutions à usage percutané dans un solvant polaire pénétrant.

15 Les compositions à application cutanée mais à effets systémiques sont particulièrement originales puisqu'il a été démontré que dans ces conditions les substances biologiquement actives extraites de plantes de la famille des Dictyotales appliquées sur les kératinocytes (épiderme cutané) étaient susceptibles de stimuler la sécrétion d'un facteur en agissant sur les chondrocytes, les synoviocytes, les ostéoblastes et, sans doute, sur d'autres cellules  
20 mésenchymateuses.

La présente invention concerne également des implants, caractérisés en ce qu'ils renferment à titre de principe actif une ou plusieurs substances biologiquement actives extraites des plantes de la famille des Dictyotales, en association ou en  
25 mélange avec un excipient ou un véhicule inerte, non toxique, approprié à l'usage envisagé, et éventuellement un ou plusieurs principes actifs à action complémentaire.

Les exemples et résultats suivants illustrent l'invention. Ils ne la limitent en aucune  
30 façon.

**EXEMPLE I**

**Etude de l'activité des substances extraites de plantes de la famille des Dictyotales.**

5    **1) Etude de l'activité**

Une étude d'activité a été réalisée sur toute les fractions susceptibles d'être isolées lors d'une chromatographie liquide haute performance ou d'une chromatographie haute pression afin de montrer que les effets observés sont bien  
10    imputables à des substances biologiquement actives spécifiques des plantes.

Le demandeur a utilisé deux méthodes d'évaluation semi-quantitative pour étudier l'activité de ces plantes.

15    A partir d'une culture cellulaire ou tissulaire, on détecte le constituant de la matrice extracellulaire sélectionné soit par immunomarquage des cellules fixées grâce à son anticorps spécifique ; soit après destruction des cellules, on réalise une chromatographie sur gel ou une électrophorèse (chromatographie sous champ électrique) avec révélation et identification de la substance par anticorps spécifique.

20

Dans les deux cas, l'anticorps spécifique est révélé par un deuxième anticorps couplé soit à une molécule fluorescente, soit à un enzyme dont l'activité met en évidence un chromophore apporté par un substrat.

25    La quantification relative peut être réalisée par analyse d'image (immunofluorescence) ou par simple spectrophotométrie lors de l'emploi d'un substrat coloré (Western Blot). Lorsque l'analyse d'image est nécessaire, on utilise un analyseur BIOCOM 200 qui quantifie les résultats à partir de plusieurs clichés obtenus sur plusieurs cultures cellulaires. Dans tous les cas, les valeurs  
30    s'expriment en valeur relative (évaluation semi-quantitative) par rapport à un témoin et/ou par rapport à la qualité totale des protéines synthétisées. L'évaluation semi-quantitative permet de comparer les résultats entre eux. Néanmoins, il n'est pas possible de comparer la synthèse d'un composé à celle d'un autre en raison

de l'affinité des anticorps qui, bien que spécifiques, n'est pas la même pour deux couples antigène-anticorps. Les résultats sont comparables entre eux pour un même anticorps.

- 5 On a étudié les synthèses matricielles des cellules isolées à partir de fragments de tissus prélevés lors d'interventions de chirurgie. Les cultures ont été réalisées en culture primaire monocouche et les résultats ont été confirmés par des cultures cellulaires tridimensionnelles. Les cultures de fragments tissulaires, peau, articulations, os, fournissent des résultats équivalents.

10

## **2) Résultats**

Les résultats sont exprimés par un nombre correspondant à la valeur du signal perçu.

- 15 Dans les tableaux ci-dessous, les lettres « SBA » désignent les substances biologiquement actives extraites des plantes de la famille des Dictyotales.

- Acide dermatane sulfurique synthétisé par les fibroblastes humains en culture primaire monocouche :

	moyenne	écart type
fibroblastes en milieu témoin	32	0,54
fibroblastes avec un milieu additionné de SBA	625	21,87

20

- Acide hyaluronique synthétisé par les fibroblastes humains en culture primaire monocouche :

	moyenne	écart type
fibroblastes en milieu témoin	75	0,67
fibroblastes avec un milieu additionné de SBA	428	52,10

- Acide chondroïtine sulfurique synthétisé par les chondrocytes humains en culture

25

	moyenne	écart type
chondrocytes témoins	56	0,85
chondrocytes avec SBA	445	19,45



- Acide hyaluronique synthétisé par les chondrocytes humains en culture primaire monocouche :

	moyenne	écart type
chondrocytes témoins	58	17
chondrocytes avec SBA	108	21

### 5 3) Contrôle de l'activité

Ce contrôle a été réalisé conformément aux indications de la littérature en culture tridimensionnelle.

Ici, on a utilisé un gel d'acide alginique.

10

- Acide chondroïtine sulfurique synthétisé par les chondrocytes humains en culture tridimensionnelle :

	moyenne	écart type
chondrocytes témoins	37	7
chondrocytes avec SBA	94	8

- Acide hyaluronique synthétisé par les chondrocytes humains en culture tridimensionnelle :

15

	moyenne	écart type
chondrocytes témoins	48	36
chondrocytes avec SBA	151	50

Des résultats tout à fait similaires ont été obtenus avec des cultures d'ostéoblastes issus de prélèvement d'os sur diverses variétés de mammifères.

- 20 De plus, pour confirmer ce résultat, les substances biologiquement actives extraites de plantes de la famille des Dictyotales ont été appliquées à des cultures tissulaires de cartilages normaux et lésés. On a constaté que le cartilage lésé était pauvre en synthèse et, dans ses réserves en glycosaminoglycanes du type chondroïtine sulfate et acide hyaluronique. Le cartilage lésé traité par les
- 25 substances biologiquement actives, extraites de plantes de la famille des Dictyotales, a présenté des taux de synthèse supérieurs au témoin sain, non traité par les substances actives.

#### **4) Action pharmacologique des substances biologiquement actives**

L'action pharmacologique des substances biologiquement actives extraites des plantes de la famille des Dictyotales est objectivée par :

5

a) Les activités réparatrices des substances en présence d'un agent inhibiteur délétère de la matrice extra cellulaire.

b) L'action indirecte des substances via un messenger tel qu'une cytokine, un facteur de croissance ou une hormone.

10

Aujourd'hui, la littérature s'accorde à décrire la plupart des phénomènes arthrosiques comme consécutifs à une dégénérescence des surfaces articulaires.

##### **a) Activités réparatrices**

15 L'activité thérapeutique d'une substance s'envisage à travers la possibilité de répondre à l'action délétère d'un intervenant biologique responsable du processus pathologique. L'interleukine 1 (IL-1) est l'intervenant physiologique majoritaire.

20 C'est pourquoi, on a évalué l'activité des substances biologiquement actives extraites des plantes de la famille des Dictyotales sur la production des glycosaminoglycanes élaborés par les cellules mésenchymateuses cultivées en présence d'IL-1.

##### **• Résultats des cultures en présence d'IL-1**

25

• Acide hyaluronique synthétisé par les fibroblastes humains en culture monocouche :

	moyenne	écart type
Fibroblastes cultivés en présence d'IL-1	36	9
Fibroblastes cultivés en présence d'IL-1 et de SBA	451	50

30

- Acide dermatane sulfurique ou acide chondroïtine sulfurique synthétisés par les fibroblastes humains en culture monocouche :

	moyenne	écart type
Fibroblastes cultivés en présence d'IL-1	14	9
Fibroblastes cultivés en présence d'IL-1 et de SBA	632	17

- 5 • Acide hyaluronique synthétisé par les ostéoblastes humains en culture monocouche :

	moyenne	écart type
Ostéoblastes cultivés en présence d'IL-1	38	1
Ostéoblastes cultivés en présence d'IL-1 et de SBA	232	5

- Acide chondroïtine sulfurique synthétisé par les ostéoblastes humains en culture monocouche :

	moyenne	écart type
Ostéoblastes cultivés en présence d'IL-1	28	5
Ostéoblastes cultivés en présence d'IL-1 et de SBA	280	12

- 10 • Acide hyaluronique synthétisé par les chondrocytes humains en culture tridimensionnelle :

	moyenne	écart type
Chondrocytes cultivés en présence d'IL-1	78	16
Chondrocytes cultivés en présence d'IL-1 et de SBA	125	17

- Acide chondroïtine sulfurique synthétisé par les chondrocytes humains en culture tridimensionnelle :

	moyenne	écart type
Chondrocytes cultivés en présence d'IL-1	25	3
Chondrocytes cultivés en présence d'IL-1 et de SBA	470	21

On a obtenu le même genre de résultats avec d'autres types cellulaires ainsi qu'en culture d'explants. L'évaluation semi-quantitative avec des explants est difficile car il faut tenir compte des plans de coupe.

5 **b) Action Indirecte**

Le Demandeur a constaté que, d'une manière surprenante, les cellules incubées avec les substances biologiquement actives (SBA) extraites de plantes de la famille des Dictyotales étaient susceptibles de transmettre le signal à d'autres  
10 cellules, signal que celles ci percevaient lors de la mise en contact avec les substances biologiquement actives. Ces substances biologiquement actives peuvent donc stimuler la sécrétion d'un deuxième messenger. Ce messenger atteint d'autres types cellulaires et stimule la synthèse des protéoglycanes.

15 Pour mettre en évidence ce phénomène, des essais ont été effectués de la manière suivante :

A une culture de kératinocytes (cellules de l'épiderme humain), on a ajouté dans le milieu de culture, les substances biologiquement actives. Après plusieurs heures  
20 d'incubation, les cellules sont rincées plusieurs fois afin d'éliminer le reste des substances biologiquement actives (SBA). Puis, un milieu neuf (K.E.M. ou Mac Coy par exemple) sans sérum de veau foetal, ni animal, est ajouté. Après une nouvelle incubation, ce milieu est prélevé. Le milieu conditionné ainsi obtenu est lyophilisé. Le lyophilisat est repris puis dilué au  $\frac{1}{4}$  ou au  $\frac{1}{10}$  par le milieu  
25 spécifique dans lequel va s'opérer la deuxième culture (DMEM pour des fibroblastes, Mac Coy pour des ostéoblastes par exemple). Les cultures de cellules traitées par le milieu conditionné provenant des kératinocytes, augmentent la synthèse des protéoglycanes dans les mêmes rapports que si elles avaient été  
30 elles-mêmes traitées directement par les substances biologiquement actives alors que celles incubées en présence d'un milieu conditionné par les kératinocytes mais non incubés par les substances biologiquement actives n'ont pratiquement pas modifié leur synthèse.

De plus, la réponse au milieu conditionné varie, selon que la reprise du lyophilisat avant dilution se fait avec de l'alcool ou avec un milieu aqueux.

Dans certaines conditions expérimentales, les ostéoblastes répondent mieux lorsque le milieu conditionné par des kératinocytes est repris par de l'alcool, alors que le même traitement, entre d'une part les fibroblastes et, d'autre part les ostéoblastes, donne une meilleure réponse si le lyophilisat est repris par le milieu directement. Cela laisse supposer que les messagers sécrétés par les cellules et donnant un même signal pour une même population, sont différents. Cet essai permet d'envisager la possibilité de modifier la synthèse des protéoglycanes de tissus plus profond que la peau, par une application d'une composition, contenant les composants actifs, sur les kératinocytes de la peau ou sur les tissus épithéliaux.

## 15 **EXEMPLE II**

### **Compositions**

1) A titre d'exemple, on peut préparer un des extraits (contenant les substances biologiquement actives) suivants :

20

plante séchée	200 g
cyclo hexane	1 000 g

ou :

plante séchée	200 g
éthanol	1 000 g

25

Fixation de l'extrait contenant les substances biologiquement actives (SBA) sur un support :

solution organique	200 g
hydroxypropylméthylcellulose	1 000 g

la solution organique est évaporée sur le support de dérivé cellulosique.

ou :

solution organique	20g
Polyéthylèneglycol (P.E.G) 4000 ou 6000	1 000 g

la solution organique est distillée dans le PEG liquide ou solide. Les rapports solution organique/support sont très variables et sont liés à l'effet recherché (effet de masse, formulation retardée, action in situ, action systémique en général, etc...).

## 2) Compositions à usage général

La formulation de gélules et de comprimés, dans lesquels les substances actives sont extraites à l'éthanol et fixées sur un support inerte, s'est avérée être la plus simple. Pour ce faire, les substances biologiquement actives extraites à l'éthanol sont mélangées à de la cellulose microcristalline, à un agent lubrifiant comme le talc, et à un adjuvant de compression comme le béhénate de glycérol.

On réalise des gélules en utilisant l'adsorbat des substances biologiquement actives extraites à l'éthanol, fixé sur polyéthylèneglycol 4000 ou 6000 et dilué avec de la silice colloïdale type Aérosil® ou Sippernat®.

La voie transcutanée est formulée classiquement, avec ou sans réservoir, et avec des excipients classiques du type Transcutol®.

La voie injectable est envisageable avec les substances biologiquement actives purifiées mises en solution dans un liquide adapté pour l'injection en solution ou en suspension.

### Exemples de formulation :

a) Gélules à base de substances biologiquement actives (SBA) extraites de plantes de la famille des Dictyotales :

SBA fixées sur polyéthylèneglycol 6000	95 %
Silice	5 %

Le remplissage des gélules se fait de la manière habituelle.

- 5 b) Comprimés à base de substances biologiquement actives (SBA) extraites de plantes de la famille des Dictyotales :

SBA fixées sur cellulose	25 %
Cellulose	65 %
Talc	1.5 %
Béhénate de glycérol	8.5 %

- 10 Les compositions préférées pour l'usage pharmaceutique sont les formes administrables par voie orale comme les comprimés, les dragées, les gélules, les capsules contenant comme principe actif au moins une substance biologiquement active extraite de plantes de la famille des Dictyotales ou un adsorbat de substances actives sur un support inerte, en association ou en mélange avec un diluant ou un excipient inerte, non toxique, pharmaceutiquement compatible, et
- 15 éventuellement un ou plusieurs principes actifs à action complémentaire.

- Pour l'usage alimentaire, les substances biologiquement actives extraites de plantes de la famille des Dictyotales seront diluées dans un support alimentaire nutritif comme une farine, ou inerte comme de la cellulose ou une préparation riche
- 20 en cellulose.

Ces compositions s'adressent notamment à l'élevage des crustacés, et par exemple des crevettes.

- 25 Exemple : les crevettes.

SBA	12,1
Dulectin	23,9
Carbonate de Calcium	5,0
Prêle	1,0
Poudre germe de blé	54,05
Sippemat	3,95

Cette formulation, administrée à la dose de 1.5 kg en un mois à un bassin de 180 000 crevettes, a permis l'amélioration de la survie à l'éclosion de 30 % et un gain de poids de l'animal à maturité de 10 %  $\pm$  2 %.

- 5 Ainsi, les substances biologiquement actives permettent d'augmenter le poids moyen des animaux et/ou de raccourcir les temps de maturation.

Une expérience similaire sur des poules pondeuses a montré que le nombre d'oeufs cassés lors du deuxième cycle de ponte était diminué de 2 %.

10

### **3) Compositions à usage loco-régional**

L'usage d'implants (pellets : petits comprimés mis en place sous la peau) est déjà classique. Il a trouvé de larges applications dans le traitement hormonal substitutif.

- 15 Il permet un traitement prolongé. La mise en place par voie chirurgicale de biomatériaux tels les polymères de synthèse (acide polylactique, acide polyacrylique), de minéraux : hydroxylapatite, phosphates de calcium, de biomatériaux : nacre, corail... imprégnés de principes actifs consistant en les substances biologiquement actives extraites de plantes de la famille des
- 20 Dictyotales est envisagée et conduit sans aucun doute à des résultats intéressants sur la relance de la synthèse des protéoglycanes de la matrice extracellulaire.

### **4) Compositions topiques destinées aux applications à visée générale, dermatologique ou cosmétique**

25

Pour l'usage dermatologique et cosmétique, on utilisera de préférence les crèmes ou les gels, dont l'utilisation dans ce domaine est la plus commode et la plus efficace. Sans être limitatives, ces formulations utilisent les émulsions de type huile dans l'eau ou eau dans l'huile. Ces émulsions sont appelées laits, crèmes de jour

30 ou de nuit, dans certaines applications du domaine de la cosmétologie et dans les applications de la dermatologie, onguents, gels, formulations mixtes gel-crème.



A titre d'exemple, on pourra citer une formulation en émulsion ; ces formulations contiennent toutes au moins trois constituants : eau, corps gras, émulsifiants ou tensio-actifs. Bien évidemment, d'autres substances comme des colorants, des agents de texture, des principes actifs associés ou non, des conservateurs, des stabilisants de pH, d'oxydation, peuvent intervenir dans la formule finale. Les onguents sont des formulations ne regroupant que des excipients lipophiles. Les gels sont des compositions ayant un aspect diaphane dans lesquelles l'eau ou parfois des composants lipophiles (ou silicones) sont à l'état de colloïdes ou en suspension colloïdale.

La concentration en substances biologiquement actives (SBA) peut varier dans de larges proportions, comprises entre 0.01 % et 20 % de la masse de l'émulsion, 0.01 % étant la dose seuil. Il peut être envisagé également d'utiliser des formes encapsulées de substances biologiquement actives (liposomes, nanosphères, nanocapsules,...) car celles-ci sont susceptibles d'augmenter l'activité. Avec 20 % de principe actif, il est nécessaire de modifier de manière considérable la formulation, l'activité étant sans doute en plateau.

Les formes modernes de formulation font également appel à des gels. Beaucoup de ceux-ci sont formulés à l'aide de polymères dérivés de l'acide acrylique décrits sous le nom de Carbomères. D'autres types de molécules peuvent donner des gels comme la cellulose et ses dérivés, les silices colloïdales, les polymères d'acide uronique, les mannanes, galactomannanes, les gommes xanthanes, etc...

Exemple : Crème huile dans l'eau renfermant des substances actives extraites à l'éthanol préalablement amenées à sec.

Téfose 2000 ®	11
Cire de lanoline	3,5
Géléol ®	3,5
Eau	76,7
Conservateur	qs
SBA (hydrosoluble)	5,0
Parfum	0,3

SBA sous forme vésiculaire (liposomes...)	0,5
Carbomère	0,5
Solution de Na OH (10 %)	QSpH 6,5
Eau	QSP 100 ml
Conservateur, colorant	

Il est évidemment possible d'envisager d'autres formulations dans les applications topiques, pharmaceutiques et cosmétiques, comme les éponges, les timbres à effet local, les poudres, les batonnets (stick et rouge à lèvres),...

10

15

20

25

30

## REVENDICATIONS

1. Substances biologiquement actives, remaniant la synthèse des éléments glycosylés de la matrice extracellulaire des tissus animaux et humains,  
5 extraites de plantes de la famille des Dictyotales.
2. Substances biologiquement actives selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont de structure polycyclique portant une chaîne latérale ayant de 4 à 10 atomes de carbone en ligne droite ou ramifiée et comportant une  
10 ou deux doubles liaisons.
3. Substances biologiquement actives selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisées en ce qu'elles présentent les données analytiques suivantes :
  - des temps de rétention, en chromatographie liquide haute performance semi-préparative sur le support silice greffé diol et avec un éluant  
15 hexane/isopropanol 92/8, compris entre 20 et 25 min et 35 et 40 min
  - un temps de rétention, en chromatographie liquide haute performance semi-préparative sur le support silice greffée C<sub>18</sub> et avec un éluant acétonitrile/eau 85/15, compris entre 15 et 17 min
  - des temps de rétention, en chromatographie liquide haute performance  
20 semi-préparative sur le support silice greffée C<sub>18</sub> et avec un éluant acétonitrile/eau/acide acétique 85/15/0,05, compris entre 17 et 20 min et 30 et 40 min
  - un temps de rétention, en chromatographie haute pression sur colonne de  
25 silice normale et avec un éluant heptane/éther (90/10), compris entre 6,9 min et 8,5 min
  - un temps de rétention, en chromatographie liquide haute performance garnie d'une colonne de silice greffée C<sub>18</sub> et avec un éluant méthanol/eau  
30 80/20, compris entre 16 et 18 minutes.
4. Substances biologiquement actives selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisées par :

un spectre UV dans le méthanol, présentant plusieurs bandes d'absorption situées à 202 nm avec un épaulement à 228 nm, entre 260 et 270 nm, entre 400 et 460 nm, et à 630 nm,

- une chromatographie sur couche mince (CCM) présentant, après révélation chimique (anisaldéhyde sulfurique, vanilline sulfurique, phosphomolybdate, acide sulfurique éthanolique), des temps de rétention frontale de 0,15, 0,90 et 0,95.

5. Substances biologiquement actives selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisées en ce qu'elles sont adsorbées sur un matériau inerte, minéral ou organique, puis dessolvatées.

6. Procédé d'obtention des substances biologiquement actives selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'on soumet la plante de la famille des Dictyotales à un séchage, et/ou à une lyophilisation puis à un broyage, suivi d'un ou plusieurs épuisements de la matière végétale par un solvant organique choisi dans le groupe formé des alcanols inférieurs, des cétones aliphatiques, des alcanes, des cycloalcanes, des solvants halogénés, des solvants aromatiques, des esters, des éthers et similaires, pour obtenir un extrait organique de la plante, on sèche l'extrait organique par évaporation du solvant, on purifie l'extrait organique sec par une ou plusieurs étapes de purification réalisées successivement par affrontement liquide/liquide, par chromatographie sur colonne basse pression ou haute pression, par chromatographie liquide haute performance, pour obtenir les substances actives des plantes de la famille des Dictyotales.

7. Procédé d'obtention des substances biologiquement actives selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'on utilise de préférence l'éthanol ou l'acétone en tant que solvant organique.

8. Procédé d'obtention des substances biologiquement actives selon les revendications 6 et 7, caractérisé en ce que les rapports utilisés entre la matière végétale (plante) et le solvant organique sont de préférence de 1 g

de matière végétale pour 5 ml de solvant, et les temps de contact entre la matière végétale et le solvant organique sont compris entre 12 heures et 5 jours.

- 5     9. Compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires remaniant la  
synthèse des éléments glycosylés de la matrice extracellulaire des tissus  
animaux et humains, caractérisées en ce qu'elles renferment à titre de  
principe actif une ou plusieurs substances biologiquement actives selon l'une  
des revendications 1 à 5, en association ou en mélange avec un excipient ou  
10     un véhicule inerte, non toxique, approprié à l'usage envisagé, et  
éventuellement un ou plusieurs principes actifs à action complémentaire.
10. Compositions selon la revendication 9, dans lesquelles l'excipient ou le  
véhicule inerte est l'un de ceux qui conviennent pour l'administration par voie  
15     digestive, parentérale, percutanée, topique ou rectale.
11. Utilisation des substances biologiquement actives selon l'une des  
revendications 1 à 5, en vue de la réalisation de compositions destinées à  
remanier la synthèse des éléments glycosylés de la matrice extracellulaire  
20     des tissus animaux et humains.
12. Utilisation des substances biologiquement actives selon l'une des  
revendications 1 à 5, en vue de la réalisation de compositions destinées à  
stimuler la synthèse des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes de la  
25     matrice extracellulaire des tissus animaux et humains.
13. Utilisation des substances biologiquement actives selon l'une des  
revendications 1 à 5, en vue de la réalisation de compositions destinées à  
stimuler les synthèses golgiennes et membranaires des glycosaminoglycanes  
30     de la matrice extracellulaire et les synthèses golgiennes des protéoglycanes  
de la matrice extracellulaire.

14. Utilisation des substances biologiquement actives selon l'une des revendications 1 à 5, en vue de la réalisation de compositions destinées à prévenir et/ou à traiter les affections impliquant des éléments glycosylés de la matrice extracellulaire des tissus animaux et humains.

5

10

15

20

25

30

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 97/00106

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K35/80 A23L1/337 A01K61/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 655 250 A (TEXINFINE ;PATRINOVE (FR)) 31 May 1995 see the whole document ---	1-14
A	BRITISH PHYCOLOGICAL JOURNAL, vol. 21, no. 2, June 1986, pages 217-224, XP000601600 MEGUMI OKAZAKI ET AL.: "A STUDY OF CALCIUM CARBONATE DEPOSITION IN THE GENUS PADINA (PHAEOPHYCEAE, DICTYOTALES)" see the whole document -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 May 1997

Date of mailing of the international search report

05.06.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Rempp, G

...ormation on patent family members

PCT/FR 97/00106

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema- Internationale No  
PCT/FR 97/00106

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 A61K35/80 A23L1/337 A01K61/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 655 250 A (TEXINFINE ;PATRINOVE (FR)) 31 Mai 1995 voir le document en entier ---	1-14
A	BRITISH PHYCOLOGICAL JOURNAL, vol. 21, no. 2, Juin 1986, pages 217-224, XP000601600 MEGUMI OKAZAKI ET AL.: "A STUDY OF CALCIUM CARBONATE DEPOSITION IN THE GENUS PADINA (PHAEOPHYCEAE, DICTYOTALES)" voir le document en entier -----	

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 Mai 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05.06.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo, nl.  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Rempp, G

## Renseignements relatifs aux familles de brevets

PCT, FR 97/00106

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0655250 A	31-05-95	FR 2712810 A	02-06-95
-----			